

=> s DD285992/pn
L1 1 DD285992/PN

=> d 1-

YOU HAVE REQUESTED DATA FROM 1 ANSWERS - CONTINUE? Y/(N):y

L1 ANSWER 1 OF 1 WPINDEX COPYRIGHT 2005 THE THOMSON CORP on
STN

ACCESSION NUMBER: 1991-164850 [23] WPINDEX

DOC. NO. CPI: C1991-071377

TITLE: Electrical fusion of myeloma and antigen-stimulated cells
- isolated by selective attachment to antigen bonded to
carrier, deposited on one electrode of the fusion appts..

DERWENT CLASS: B04 D16

PATENT ASSIGNEE(S): (DEAK) AKAD WISS DDR MOLE; (POLY-N) INST
POLYMERENCHEMIE

COUNTRY COUNT: 1

PATENT INFORMATION:

PATENT NO	KIND	DATE	WEEK	LA	PG
DD 285992	A	19910110 (199123)*		<--	

APPLICATION DETAILS:

PATENT NO	KIND	APPLICATION	DATE
DD 285992	A	DD 1989-331001	19890720

PRIORITY APPLN. INFO: DD 1989-331001 19890720
AB DD 285992 A UPAB: 19930928

Cell fusion process comprises introducing various cells (or cell mixts.) into a weakly conducting, isotonic aq. soln. between 2 parallel plate electrodes, application of a high-frequency electric alternating field (dielectrophoresis), then application of a high d.c. voltage impulse, and recovery of the fused cells. The new feature is that, before introduction between the electrodes, a cell mixt. contg. stimulated cells is deposited on a flat carrier to the surface of which are covalently bonded antigens (Ag) used for the cell stimulation so that the stimulated cells become fixed by interaction between cell membrane receptors and immobilised Ag. Non-fixed cells are removed by rinsing (without loss of fixed cells) then the carrier is placed between the electrodes. Mycloma cells are applied at high density to the carrier, brought into membrane contact with the fixed cells by sedimentation and application of a high-frequency a.c. field, then the 2 types of cell fused by application of the a.c. field and d.c.

pulse. Non-fused myeloma cells are removed from the carrier by rinsing (without loss of fused cells), then fused prods. transferred to a growth medium outside the fusion appts.

USE/ADVANTAGE - To make hybridomas for use in gene or immune technology, or for prodn. of therapeutically useful antibodies.

0/0

IC C12N013-00; C12N015-02

Best Available Copy

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

PATENTSCHRIFT

(11) DD 285 992 A5

5(51) C 12 N 13/00
C 12 N 15/02

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 12 N / 331 001 4 (22) 20.07.89 (44) 10.01.91

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72) Dreyer, Günter, Dr.-Ing. Dipl.-Ing.; Stolley, Peter, Dr. rer. nat. Dipl.-Ing.; Walther, Ingrid; Paul, Dieter, Dr. sc. Dipl.-Chem.; Junge, Claudia, Dr. rer. nat. Dipl.-Biophys.; Weihner, Katrin, Dipl.-Chem.; Richau, Klaus, Dr. rer. nat. Dipl.-Phys.; Schwarz, Hans-Hartmut, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DD
(73) Akademie der Wissenschaften der DDR, Zentralinstitut für Molekularbiologie, Berlin-Buch, 1115; Institut für Polymerenchemie, Teltow-Seehof, 1530, DD
(74) Zentralinstitut für Molekularbiologie, Arbeitsgemeinschaft Patent- und Neuererwesen, Robert-Rössle-Straße 10, Berlin-Buch, 1115, DD

(54) Zellfusionsverfahren

(55) Zellfusionsverfahren; Elektrofusion; Hybridomtechnik; Flächenträger; Immobilisierung, selektiv
(57) Es wird ein Zellfusionsverfahren zur Fusion im elektrischen Feld dargestellt. Das Verfahren ist für die Biotechnologie, insbesondere die Hybridomtechnik und die Medizin anwendbar. Die erfindungsgemäße Verwendung eines Flächenträgers zur antigenspezifischen Immobilisierung von Zellen aus einem Zellgemisch, zur Durchführung der Elektrofusion und zur Kultivierung der fusionierten Zellen ermöglicht eine hohe Ausbeute und eine einfache, schnelle Durchführung des Verfahrens.

ISSN 0433-6461

3 Seiten

Best Available Copy

- 1 - 285 992

Patentansprüche:

1. Zellfusionsverfahren, bestehend aus dem Einbringen verschiedener Zellen oder Zellgemische in einer schwach leitfähigen, isotonen, wässrigen Lösung zwischen zwei parallele Plattenelektroden, dem Anlegen eines hochfrequenten elektrischen Wechselfeldes (Dielektrophorese), dem anschließenden Anlegen eines hohen elektrischen Gleichspannungsimpulses und der Gewinnung der fusionierten Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß ein Zellgemisch mit stimulierten Zellen vor dem Einbringen zwischen die Plattenelektroden auf einen Flächenträger gegeben wird, an dessen Oberfläche die zur Zellstimulierung verwendeten Antigenmoleküle kovalent gebunden sind, die stimulierten Zellen über die Wechselwirkung zwischen Zellmembranrezeptoren und den trägerfixierten Antigenmolekülen spezifisch am Flächenträger gebunden werden, die nichtgebundenen Zellen durch Spülen vom Flächenträger entfernt werden, ohne die gebundenen Zellen abzulösen, der Flächenträger mit den gebundenen, stimulierten Zellen zwischen die Plattenelektroden eingebracht wird, Myelomzellen in hoher Dichte auf den Flächenträger gegeben werden, die Myelomzellen durch Sedimentation und unter zusätzlicher Einwirkung eines angelegten hochfrequenten elektrischen Wechselfeldes mit den am Flächenträger gebundenen, stimulierten Zellen in Membrankontakt gebracht werden, die Zellpärchen durch ein hochfrequentes elektrisches Wechselfeld und einen anschließenden hohen Gleichspannungsimpuls in an sich bekannter Weise fusioniert werden, der Flächenträger durch eine Spülung von den überflüssigen, nicht fusionierten Myelomzellen befreit wird, ohne die gebundenen Fusionsprodukte abzulösen und diese Fusionsprodukte mit dem Flächenträger außerhalb der Fusionsvorrichtung zur Kultivierung im Wachstumsmedium überführt werden.
2. Zellfusionsverfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Flächenträger eine Zellulosemembran verwendet wird, die durch vollständige alkalische Hydrolyse aus konventioneller Acetat-(2^{1/2}-)Methylester hergestellt wird, einen Restacetylgehalt von weniger als 1% besitzt und deren Dicke zwischen 100 und 500 µm, vorzugsweise 150 bis 250 µm beträgt.
3. Zellfusionsverfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß ein Flächenträger verwendet wird, der porös ist, die Poren kleiner als 100 nm sind und der Porenabstand klein gegenüber dem Durchmesser der stimulierten Zellen ist.
4. Zellfusionsverfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Flächenträger, auf dessen Oberfläche die zur Zellstimulierung verwendeten Antigenmoleküle kovalent gebunden sind, vor der kovalenten Bindung durch solche chemischen Mittel aktiviert wurde, die keine zusätzlichen positiven Festladungen an der Oberfläche des Flächenträgers erzeugen.
5. Zellfusionsverfahren nach Ansprüchen 2 und 4 oder 2, 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß als chemische Mittel zur Aktivierung des Flächenträgers Natriumperjodat oder Chlorameisensäurenorbonylester verwendet werden.
6. Zellfusionsverfahren nach Ansprüchen 2 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß als im Zellgemisch befindliche stimulierende Zellen B-Lymphozyten verwendet werden, die mit Antigenmolekülen stimuliert wurden und über Wechselwirkungen zwischen den Membranrezeptoren der stimulierten Zellen und den kovalent an den Flächenträger gebundenen Antigenmolekülen an den Flächenträger fixiert wurden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung ist auf dem Gebiet der Biotechnologie, insbesondere der Gen- und Immuntechnik, und zur Schaffung der Voraussetzungen für Antikörper-Therapien in der Medizin anwendbar.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Bei den bekannten Fusionsverfahren werden die Fusionspartner gemeinsam suspendiert, durch mechanische oder elektrische Kräfte (Zentrifugation oder Dielektrophorese) in einen Zustand innigen Zell-Zell-Kontaktes versetzt und durch chemische Stoffe oder elektrische Felder miteinander fusioniert. Art und Häufigkeit der entstehenden Fusionsprodukte unterliegen dem Zufall. Die Ausbeute an interessierenden Fusionsprodukten ist gering, insbesondere wenn einer der beiden Fusionspartner im Zellgemisch nur in geringer Konzentration vorhanden ist (z. B. antigenspezifisch stimulierte B-Lymphozyten in einem Leukozytengemisch). Die interessierenden Fusionsprodukte werden mit Hilfe von Selektionsmedium aus dem Zellgemisch isoliert. Dieser Vorgang ist langwierig und verringert außerdem die Vitalität der Zellhybride. Die in DE 3505147 angegebene technische Lösung ersetzt die rein zufälligen Paarungen durch eine getrennte Fixierung der Fusionspartner (z. B. der Myelomzellen und der Leukozyten) auf zwei Flächenträgern, die mechanisch aufeinander zu bewegt werden, bis es zum Zell-Zell-Kontakt kommt. Nachfolgend wird die

Best Available Copy

- 2 - 285 992

Zellfusion elektrisch induziert. Die interessierenden Fusionsprodukte (z.B. Hybridome) müssen allerdings ebenfalls mittels Selektionsmediums isoliert werden, da z.B. eine Separierung der stimulierten B-Lymphozyten aus einem Leukozytengemisch vor der Fusion bei diesem Verfahren nicht möglich ist.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung ist, bei einem Zellfusionsverfahren Arbeitszeit und Selektionsmaterial einzusparen und einen effektiveren, breiteren Einsatz der Hybridomtechnik für die biotechnologische Produktherstellung zu ermöglichen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, ein Verfahren zu finden, mit dessen Hilfe die Ausbeute der elektrisch induzierten Zellfusion bei der Hybridomtechnik gesteigert wird und die weitere Kultivierung der Hybridome einfach und effektiv ist; insbesondere soll der Anteil an Fusionsprodukten aus einer Myelomzelle und einem antigenspezifisch stimulierten B-Lymphozyten erhöht werden. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß z. B. ein Leukozytengemisch mit antigenspezifisch stimulierten B-Lymphozyten auf einen Flächenträger gegeben wird, dessen Oberfläche chemisch aktiviert ist und an der die zur Stimulierung verwendeten Antigenmoleküle kovalent gebunden sind. Die stimulierten Zellen werden durch die Wechselwirkung zwischen den Zellmembranrezeptoren und den trägefixierten Antigenmolekülen spezifisch um Flächenträger gebunden. Die restlichen Zellen werden durch Spülen entfernt. Die chemischen Aktivierungsmittel dürfen am Flächenträger zu keinen zusätzlichen positiven Festladungen führen, damit die unspezifische Bindungsfähigkeit für Zellen gering bleibt. Die poröse Struktur des Flächenträgers ermöglicht eine Ionenleitfähigkeit in Richtung der Flächennormalen, so daß ein in dieser Richtung angelegtes elektrisches Feld auf die trägefixierten Zellen in nahezu gleicher Weise wirkt wie auf suspendierte Zellen in Abwesenheit des Flächenträgers. Der Durchmesser und der Abstand der Poren sind klein gegenüber dem Durchmesser der Zellen. Dadurch wird eine unspezifische Festsetzung der Zellen verhindert und darüber hinaus bei einer Dicke des Flächenträgers kleiner als 500 µm eine fast völlige Nutzung der trägefixierten, stimulierten Zellen für die Zellfusion erreicht. Die erfindungsgemäß Mindestdicke des Flächenträgers von 100 µm ermöglicht in allen Verfahrensschritten eine gute Handhabung. Nach dem Spülen wird der Flächenträger mit den gebundenen, stimulierten Zellen auf die untere Elektrode einer horizontalen Parallelplattenordnung gelegt und mit einer dichten Myelomzellensuspension überschichtet. Die obere Plattenelektrode wird der unteren bis zum Kontakt mit der Myelomzellensuspension genähert. Erfindungsgemäß ist es nicht notwendig, einen besonderen kleinen Abstand der Plattenelektroden einzustellen, da die Myelomzellen auf dem Flächenträger sedimentieren. Die hohe Myelomzelldichte und ein zusätzlich angelegtes elektrisches Hochfrequenzfeld gewährleisten, daß nahezu alle trägegebundenen Zellen mit einer Myelomzelle in Membrankontakt gelangen. Die elektrisch induzierte Fusion erfolgt in allgemeiner bekannter Weise. Durch eine Spülung werden die überflüssigen, nicht fusionierten Myelomzellen vom Flächenträger entfernt, so daß nur die trägegebundenen Fusionsprodukte verbleiben. Sie werden mit dem Flächenträger zur Kultivierung im Wachstumsmedium überführt.

Gegenüber bekannten Verfahren verknüpft das erfindungsgemäß Verfahren einfach und vorteilhaft die elektrisch induzierte Zellfusion mit einer Vorselektion der antigenspezifisch stimulierten Zellen.

Das erfindungsgemäß Verfahren zeigt seine Vorteile besonders dort, wo die Konzentration der stimulierten Zellen im Zellgemisch gering ist. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß der chemisch aktivierte Flächenträger unter bekannten Bedingungen (feucht, steril) lagerungsfähig und verschickbar ist. Dies ermöglicht eine schnelle Fusion und Kultivierung am Ort der Gewinnung des Zellgemisches.

Ausführungsbeispiel

Die Milzellen einer mit HSA immunisierten Maus (Balb/c) werden von Erythrozyten befreit (Ficoll-Visotраст-Gradient mit 1,08 g/cm³), zweimal in PBS gewaschen und in PBS resuspendiert (Zeldichte 10⁶/µl). 25 µl der Milzellsuspension werden auf einen chemisch aktivierten und mit HSA-Molekülen gekoppelten Flächenträger von 144 mm Ø und 0,2 mm Stärke geschichtet (Typ UF 80, Institut für Polymerenchemie der AdW der DDR, Teltow-Seehof) und 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Die chemische Aktivierung erfolgt mit einem Chlorameisensäurenboronyester und die HSA-Kopplung in Boratpuffer pH 8,3 mit 1 µg HSA/ml. Der mit Milzellen beschichtete Flächenträger wird in PBS gespült, bis nur noch die antigenspezifisch stimulierten B-Lymphozyten gebunden bleiben. Der Flächenträger wird in eine isotone, ionenarme Fusionslösung überführt (spezifische Leitfähigkeit 180 µS/cm) und auf die untere Plattenelektrode der Fusionskammer gelegt. Auf den Flächenträger werden 30 µl Myelomzellensuspension geschichtet (1,5 · 10⁶ Zellen in ionenarmer Fusionslösung), und die obere Plattenelektrode wird der unteren auf einen Abstand von 0,5 mm genähert. An die Plattenelektroden wird 3 Minuten lang ein schwaches, hochfrequentes elektrisches Wechselfeld angelegt (ca. 1 Hz, 12 V). Für 2 Sekunden wird die elektrische Spannung auf 35 V gesteigert und unmittelbar darauf der elektrische Fusionsimpuls appliziert (30 V, 8 µs). Der Flächenträger wird der Fusionskammer entnommen, mit 30 µl Wachstumsmedium überschichtet und 10 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert (37°C, 8% CO₂). Durch Spülen mit Wachstumsmedium werden die nicht fusionierten Myelomzellen vom Flächenträger entfernt. Die trägefixierten Fusionsprodukte werden in 1 ml Wachstumsmedium (RPMI + 15% US) kultiviert. Die Rektonierung und die Analysierung der Kulturüberstände zeigen, daß nahezu alle Zellklone HSA-spezifische Antikörper produzieren.